



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10257884 A**(43) Date of publication of application: **29 . 09 . 98**

(51) Int. Cl.

C12N 9/18
C07H 15/10
C12P 19/26
(21) Application number: **09083387**(22) Date of filing: **18 . 03 . 97**(71) Applicant: **TAKARA SHUZO CO LTD**
(72) Inventor:
ITO MAKOTO
OKINO NOZOMI
IMAYAMA SHUHEI
ONISHI KATSUNORI
(54) **SPHINGOLIPID CERAMIDE N-DEACYLASE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme, comprising a sphingolipid ceramide N-deacylase capable of acting on an intramolecular ceramide in a sphingolipid and producing a lysosphingolipid and a fatty acid and useful for the production, etc., of (lyso)sphingolipids.

SOLUTION: This new sphingolipid ceramide N-deacylase has actions on the reaction with an intermolecular ceramide in a sphingolipid, hydrolysis of the intramolecular ceramide into a sphingosine base and a fatty acid and production of a lysosphingolipid and a fatty acid, is capable of specifically acting on a

ceramide, a sphingoglycolipid and a sphingolipid, has 8-10 optimum pH and is used for the production, etc., of a lysosphingolipid and sphingolipids, useful for introducing a saccharide chain into a protein and used as a substrate for measuring activities of an enzyme related to the sphingolipids, a ligand for an affinity chromatography, an antigen for producing an antibody and for the development, etc., of a therapeutic agent for atopic dermatitis. The enzyme is obtained by culturing a microorganism, collected from skin of a patient suffering from the atopic dermatitis and capable of producing the sphingolipid ceramide N-deacylase and separating the enzyme from the resultant cultured product.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-257884

(43)Date of publication of application : 29.09.1998

(51)Int.Cl.

C12N 9/18
C07H 15/10
C12P 19/26

(21)Application number : 09-083387

(71)Applicant : TAKARA SHUZO CO LTD

(22)Date of filing : 18.03.1997

(72)Inventor : ITO MAKOTO
OKINO NOZOMI
IMAYAMA SHUHEI
ONISHI KATSUNORI

(54) SPHINGOLIPID CERAMIDE N-DEACYLASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme, comprising a sphingolipid ceramide N-deacylase capable of acting on an intramolecular ceramide in a sphingolipid and producing a lysosphingolipid and a fatty acid and useful for the production, etc., of (lyso) sphingolipids.

SOLUTION: This new sphingolipid ceramide N-deacylase has actions on the reaction with an intermolecular ceramide in a sphingolipid, hydrolysis of the intramolecular ceramide into a sphingosine base and a fatty acid and production of a lysosphingolipid and a fatty acid, is capable of specifically acting on a ceramide, a sphingoglycolipid and a sphingolipid, has 8-10 optimum pH and is used for the production, etc., of a lysosphingolipid and sphingolipids, useful for introducing a saccharide chain into a protein and used as a substrate for measuring activities of an enzyme related to the sphingolipids, a ligand for an affinity chromatography, an antigen for producing an antibody and for the development, etc., of a therapeutic agent for atopic dermatitis. The enzyme is obtained by culturing a microorganism, collected from skin of a patient suffering from the atopic dermatitis and capable of producing the sphingolipid ceramide N-deacylase and separating the enzyme from the resultant cultured product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-257884

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月29日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 9/18

C 1 2 N 9/18

C 0 7 H 15/10

C 0 7 H 15/10

C 1 2 P 19/26

C 1 2 P 19/26

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平9-83387

(22) 出願日

平成9年(1997) 3月18日

(71) 出願人 591038141

資酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72) 発明者 伊東 信

福岡県福岡市西区愛宕浜4丁目34-1

(72) 発明者 沖野 望

福岡県福岡市東区馬出4丁目2-11-106

(72) 発明者 今山 修平

福岡県福岡市城南区鳥飼4-17-1-302

(72) 発明者 大西 克典

福岡県福岡市博多区千代4丁目29-10 畠田ビル501号

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

(54) 【発明の名称】 スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ

(57) 【要約】

【課題】 新規なスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ、それを用いてリゾスフィンゴ脂質、スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を製造する方法を提供する。

【解決手段】 分子内セラミドに作用して、リゾスフィンゴ脂質と脂肪酸を生成する作用。セラミド、スフィンゴ糖脂質及びスフィンゴリン脂質に作用する基質特異性、及び8~10の至適pHをもつスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ。該酵素でスフィンゴ脂質を処理するリゾスフィンゴ脂質の製造方法。該酵素を触媒として用いて、スフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を製造する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有することを特徴とするスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ。

(1) 作用：スフィンゴ脂質中の分子内セラミドに作用して、スフィンゴシン塩基と脂肪酸とに加水分解し、リゾスフィンゴ脂質と脂肪酸を生成する。

(2) 基質特異性：セラミド、スフィンゴ糖脂質及びスフィンゴリン脂質に作用する。

(3) 至適pH：至適pHが8～10である。

【請求項2】 請求項1記載のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを用いてスフィンゴ脂質を処理することを特徴とするリゾスフィンゴ脂質の製造方法。

【請求項3】 スフィンゴ脂質を、請求項1記載のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの生産能を有する微生物と接触させることを特徴とするリゾスフィンゴ脂質の製造方法。

【請求項4】 少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質、あるいはリゾスフィンゴ脂質と脂肪酸カルボン酸又は脂肪酸カルボン酸誘導体とを、請求項1記載のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを用いて酵素的に反応させ、スフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は新規なスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼに関する。また、該スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを用いて、酵素学的にリゾスフィンゴ脂質を製造する方法、更には少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質、あるいはリゾスフィンゴ脂質と脂肪酸カルボン酸又は脂肪酸カルボン酸誘導体とを、該酵素と酵素的に反応させることによるスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、糖脂質中の分子内セラミドに作用してこのセラミド部分をスフィンゴシン塩基と脂肪酸とに加水分解し、リゾ糖脂質と脂肪酸を生成する酵素として、ノカルディア属 (*Nocardia*) に属する微生物が生産する酵素 (特開昭64-60379号公報) が知られている。この酵素は糖脂質セラミドデアシラーゼと命名されているが (ジャーナル オブ バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、第103巻、第1～4頁 (1988))、GD1a、GM1、GM2、GM3等のいわゆる酸性糖脂質であるガングリオシドには作用するが、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミドには全く作用せず、ラクトシルセラミド、Gb3、あるいはアシアロ (asialo) GM1等の中性糖脂質にはほとんど作用しない。また、セラミドのスフィンゴシン塩基と脂肪酸との結合を加水分解する酵素がセラミダーゼ (Cera-

midase; E.C.3. 5. 1. 23) と称されているが (ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第241巻、第3731～3737頁 (1966)、バイオケミストリー (Biochemistry)、第8巻、第1692～1698頁 (1969)、バイオキミカ エー バイオフィジカ アクタ (Biochimica et Biophysica Acta)、第176巻、第339～347頁 (1969)、サイエンス (Science)、第178巻、第1100～1102頁 (1972))、この酵素は糖脂質のセラミド部分のスフィンゴシン塩基と脂肪酸との結合を加水分解することはできない。すなわち、これらの酵素では中性糖脂質のセラミド部分のスフィンゴシン塩基と脂肪酸との結合を加水分解することはできなかった。また、スフィンゴ脂質全般に作用する酵素としてシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する細菌が生産する酵素 (特開平8-84587号公報、ジャーナルオブ バイオロジカル ケミストリー、第270巻、第24370～243742頁 (1995)) が知られている。この酵素は中性糖脂質、酸性糖脂質及びスフィンゴミエリンに作用するがセラミドには非常に作用しにくい。

【0003】 スフィンゴ脂質は、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴリン脂質 (スフィンゴホスホノリビドを含む)、セラミド、を含む長鎖塩基スフィンゴイドを持つ脂質の総称であり、スフィンゴイドのアミノ基に不均一な鎖長の長鎖脂肪酸を酸アミド結合したセラミドを共通構造としてもち、下等動物から高等動物にまで広く分布している。これらスフィンゴ脂質は近年、細胞の増殖、分化誘導、アポトーシス等のような生物活性において重要な役割に関与していることが明らかにされつつある。また、細胞表層の構成成分であることから化粧品等への添加物としても使用されつつある。また、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミノ基に酸アミド結合した脂肪酸を欠くスフィンゴ脂質のN-脱アシル体はリゾスフィンゴ脂質と呼ばれ、スフィンゴ脂質と同様な生物活性を持つことが明らかにされつつある。従来知られているリゾスフィンゴ脂質の製造方法については、化学的方法、酵素を用いる方法、微生物を用いる方法が知られている。化学的方法としては、ヒドラジン分解法やアルコール系溶媒中でのアルカリ加水分解法が知られている。しかし、これらの方法ではアミノ糖を含むスフィンゴ糖脂質の場合、糖鎖部分のアミド結合が分解されてデーN-アセチルリゾ糖脂質を生じる。またシアル酸を含む糖脂質 (ガングリオシド) の場合、シアル酸部分の脱アシル化反応が同時に進行する。そのため、脱アシル化後、脂質部分のアミノ基に保護基を選択的に導入した後、シアル酸部分の再アシル化を行い、その後、保護基を外す必要がある。これらの一連の化学操作では、様々な副生成物が生じ、多くの手間と技術的な熟練を要する。しかも、現在の化学的手法ではシアル酸を複数有する例えば

GQ1bのようなポリシアロガングリオシドからリゾ体を調製することは非常に困難である。一方、酵素を用いる方法としては、ノカルディア属放線菌の生産するガングリオシドセラミダーゼを用いる方法(特開昭64-60379号公報)、ロドコッカス(Rhodococcus)属放線菌の生産する酵素又は菌体処理物を用いる方法(特開平6-78782号公報)、シュードモナス属細菌の生産するスフィンゴリビドセラミドデアシラーゼを用いる方法(特開平8-84587号公報)が知られている。これらの方法では、得られるリゾスフィンゴ脂質は用いる酵素の基質特異性に左右されるため、目的のリゾスフィンゴ脂質を得るには制限がある。微生物又はその抽出物を用いる方法として、グリゴスフィンゴリビドセラミドデアシラーゼ生産能を有するストレプトミセス(Streptomyces)属放線菌を用いる方法(特開平7-107988号公報)が知られているが、効率が悪く、また、基質特異性により得られるリゾスフィンゴ脂質に制限がある。また、リゾスフィンゴ脂質を生物学的に得る方法が知られている(特開平6-78782号公報)。この方法では、目的とするリゾスフィンゴ脂質以外に多くの副産物が生じる。そのため、これら副産物を取り除く必要があり、工業的にもその操作のステップ、収率の点で問題があった。

【0004】一方、スフィンゴリン脂質であるスフィンゴミエリンのリゾ体を得る方法としては化学的方法と酵素的方法が知られており、化学的方法としてアルコール系溶媒中での塩酸加水分解に依る方法が一般に用いられる。しかしこの方法によると天然型のD-エリトロ(D-erythro)(2S,3R)だけではなくL-トレオ(L-threo)(2S,3S)の立体異性体が生じてしまい、天然型のD-エリトロ(D-erythro)(2S,3R)を得るためには収率の点で不利でありまたこれらを分離することは非常に困難であった。更にコリンリン酸基が外れる可能性があり、収率の点で問題がある。また、一般に天然のスフィンゴ脂質のセラミド部分の長鎖脂肪酸の鎖長は、不均一でかなりの多様性があることから、単一分子からなるスフィンゴ脂質を得ることは困難である。

【0005】スフィンゴ脂質の長鎖脂肪酸を修飾あるいは置換したスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法は、リゾスフィンゴ脂質を出発原料として、科学的、酵素的に合成する方法が知られている。化学的方法としては、リゾ体のアミノ基に以下の様な方法で脂肪酸あるいは脂肪酸誘導体を縮合させる方法がある。例えば、脂肪酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル等の脂肪酸活性エステルを用いる方法、脂肪酸とカルボニルジイミダゾールやジシクロヘキシルカルボジイミドなどのカップリング試薬を用いる方法、脂肪酸の無水物を用いる方法、脂肪酸塩化物を用いる方法などが知られている。酸性糖脂質のリゾ体としてリゾガングリオシドを用いる方法(メソッズ インエンザイモロジー(Method

s in Enzymology) 第138巻、第319~341頁(1987)、特開平2-200697号及び特開平7-309888号)、スフィンゴシルホスホリルコリン(リゾスフィンゴミエリン)を用いる方法(ジャーナル オブ リピッド リサーチ(Journal of Lipid Research)、第28巻、第710~718頁(1987))が知られている。これらの方法によるとO-アシル化等の副反応が起こる場合があり、選択的にN-アシル化された物質を得るためには保護基の使用、精製等に煩雑な操作が必要である。また、スフィンゴホスホリリドの一種セラミドシリアチンやアミノ糖を含むスフィンゴ糖脂質を化学的に脱アシル化して得られるデーN-アセチルリゾガングリオシドのようにスフィンゴイドのアミノ基以外にアミノ基をもつスフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミノ基だけを選択的にアシル化したいときには保護基の導入、部分的アシル化、アシル化後の部分的脱アシル化といった操作、あるいはデーN-アセチルリゾガングリオシドをリボソームに取り込ませた後、選択的にN-アシル化する等の煩雑な操作が必要であり困難を伴う。一方、酵素的合成方法は、有機溶媒中でリパーゼにより縮合を行う方法(国際公開番号WO94/26919)が知られているが、実質的に無水の有機溶媒が必要であり、基質の溶解性により基質が限定される。また、セラミド及びハイブリッドセラミドの酵素的合成方法(国際公開番号WO94/26919)も知られているが、反応も特異的なものではなくO-アシル化物の生成が見出されており、また化学的合成方法と同様に複数のアミノ基をもつ場合、スフィンゴイドのアミノ基だけに特異的に作用させることは困難である。

30 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来知られているスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼと異なる基質特異性の酵素、特にセラミド、スフィンゴ糖脂質及びスフィンゴリン脂質によく作用するスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを提供することにある。また、該スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを用いたリゾスフィンゴ脂質を酵素的に、工業的に製造する方法を提供することにある。更には、該スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの逆反応を用いたスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体の製造方法を提供することにある。

40 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、下記の理化学的性質を有することを特徴とするスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼに関する。

(1) 作用：スフィンゴ脂質中の分子内セラミドに作用して、スフィンゴシン塩基と脂肪酸とに加水分解し、リゾスフィンゴ脂質と脂肪酸を生成する。

50 (2) 基質特異性：セラミド、スフィンゴ糖脂質及びス

フィンゴリン脂質に作用する。

(3) 至適pH: 至適pHが8~10である。

また、本発明の第2の発明は、上記第1の発明のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを用いてスフィンゴ脂質を処理することを特徴とするリゾスフィンゴ脂質の製造方法に関する。また、本発明の第3の発明は、スフィンゴ脂質を、前記第1の発明のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの生産能を有する微生物と接触させることを特徴とするリゾスフィンゴ脂質の製造方法に関する。更に、本発明の第4の発明は、少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質、あるいはリゾスフィンゴ脂質と脂肪族カルボン酸又は脂肪族カルボン酸誘導体とを、前記第1の発明のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを用いて酵素的に反応させ、スフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法に関する。

【0008】本発明者らは、スフィンゴ脂質関連酵素を得るために、種々のサンプルをスクリーニングに用いた。このスクリーニングの過程で、驚くべきことに、セラミド及び糖脂質を同程度にスフィンゴシン塩基と脂肪酸とに加水分解し、それらのリゾ体と脂肪酸を生成する、従来知られていない新規なスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ活性を見出した。更に、本発明者らが、鋭意検討を行った結果、本発明の酵素を生産する微生物を特定し、該酵素の理化学的性質を明らかにした。また、該酵素を用いてスフィンゴ脂質を処理することにより、リゾスフィンゴ脂質を効率よく製造することに成功し、更に該酵素の逆反応活性を見出し、該反応を用いてスフィンゴ脂質及びスフィンゴ脂質誘導体を製造することにも成功し、本発明を完成させた。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明について具体的に説明する。本発明のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの製造方法は特に限定されるものではなく、本発明のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ生産能を有する微生物、若しくは細胞等であり。例えば、非発酵性グラム陰性桿菌A I-2が挙げられる。本菌株は、本発明者らがアトピー性皮膚炎の増悪にスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ活性が関与しているのではないかと考え、アトピー性皮膚炎患者の落屑を採取し、新たに検索した結果得た菌株であり、その菌学的性質は以下のとおりである。

【0010】(1) 形態: 桿菌

(2) グラム染色性: 陰性

(3) 孢子: 陰性

(4) 運動性: 陽性

(5) 鞭毛: 極短毛

(6) 酸素に対する態度: 好気性

(7) オキシダーゼ: 陽性

(8) カタラーゼ: 陽性

(9) OFテスト: O

(10) 集落の色調: 特徴的集落色素を生成せず

(11) 蛍光色素の生成: 陰性

(12) 水溶性色素の生成: 陰性

(13) 栄養要求性: 陽性

(14) PHBの蓄積: 陰性

(15) 40度での生育: 陽性

(16) アルギニンジヒドロラーゼ: 陰性

(17) ゼラチンの液化: 陽性

10 (18) でんぷんの分解: 陰性

(19) Tween 80の分解: 陰性

(20) 資化性

グルコース: 陽性

β -ヒドロキシ酪酸: 陰性

(21) キノン系: Q-8

(22) GC含量: 68%

この結果、本菌株は極短毛を有するオキシダーゼ陽性の非発酵性グラム陰性桿菌であり、シュドモナス・RN A group V及びステノトロフォモナス (Stenotrophomonas) 属に属するのではないかと考えられたが、その性状が完全には一致せず、新菌株の可能性が示唆された。

【0011】本菌株は、A I-2と命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16124として寄託されている。

【0012】本発明の酵素は、例えば上述した菌株を栄養培地中で培養し、培養後の培養物から酵素を分離することによって得られる。培地に加える栄養源は、該菌株が利用し本発明の酵素を生産するものであればよく、炭素源としては例えば、グリセロール、グルコース、スクロース、糖蜜等が利用でき、窒素源としては例えば、酵母エキス、ペプトン、コーンステープリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫酸、硝酸アンモニウム等が適当である。その他、ナトリウム塩、カリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、亜鉛塩等の無機質及び金属塩を加えてもよい。また培地中にスフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質を0.01~0.5%添加して本発明の酵素の生産性を高めることができる。本発明の酵素の生産菌を培養するに当り、酵素の生産量は培養条件によって大きく変動するが、一般的に培養温度は20~35℃、培地のpH6~8が良く、1日から7日の通気かくはん培養で本発明の酵素が生産される。培養条件は使用する菌株、培地組成等に応じて本発明の酵素の生産量が最大になるように設定するのは当然のことである。上述した菌株によって生産された本発明の酵素は主に菌体外に存在するので、培養物を固液分離し、得られた上清を酵素液として用いることができる。また、通常用いられる精製手段により精製酵素標品を得ることができる。例えば、塩析、有機溶媒沈殿、イオン交換カラムクロマトグラフィ、10 ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィ

一、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、凍結乾燥等により精製することができる。酵素の純度は例えば、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法等によって検定することができる。

【0013】本発明により得られるスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの酵素化学的及び理化学的性質は次のとおりである。

(1) 酵素活性の測定法： スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの酵素活性は測定は次のようにして行う。終濃度1mMの¹⁴C放射性同位元素ラベルされた炭素数16の脂肪酸を持つガラクトシルセラミド(¹⁴C-GalCer)を基質とし、0.5%トリトン(Triton) X-100を含む25mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 20μl中で37℃で3時間反応させる。100μlのクロロホルム/メタノール(2:1)を加え反応を止め、濃縮遠心機で反応液を濃縮し、これをTLCプレート(シリカゲル60、メルク社製)にのせ、クロロホルム/メタノール/0.02%塩化カルシウム水溶液(5:4:1)で展開した後、イメージングアナライザーBas1000(富士写真フイルム社製)を用いガラクトシルセラミドの量を定量する。又は、最終濃度1mMのガラクトシルセラミドを基質とし、0.5%トリトンX-100を含む25mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 20μl中で37℃で3時間反応させる。100μlのクロロホルム/メタノール/0.02%塩化カルシウム水溶液(5:4:1)で展開した後、オルシノール硫酸法で発色させ、クロマトスキャナー(島津CS

-9000、島津製作所社製)を用いて波長540nmで定量する。活性単位は1分間に1nmolのガラクトシルセラミドを分解する活性を1mUとする。

【0014】(2) 作用： スフィンゴ脂質中の分子内セラミドに作用して、スフィンゴシン塩基と脂肪酸とに加水分解し、リゾスフィンゴ脂質と脂肪酸を生成する。更に、リゾスフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミノ基への脂肪酸の再結合、あるいはスフィンゴ脂質のスフィンゴイドに酸アミド結合する脂肪酸と別の脂肪酸との置換を行い、スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を生成する。

【0015】(3) 基質特異性： (1)の酵素活性の測定法に従い、¹⁴C放射性同位元素ラベルされた脂肪酸を持つガラクトシルセラミド、ガングリオシドGM1、スフィンゴミエリン、セラミドを基質とし、反応時間を2時間と19時間で、本発明の基質特異性を調べたところ、下記表1に示すように、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴリン脂質及びセラミドに作用して、リゾスフィンゴ脂質と脂肪酸を生成する。特にセラミド及びセラミドに単糖が結合したガラクトシルセラミドによく作用する。

表1中、ガングリオシドGM1は、ウシ脳から調製し(メソツズ インエンザイモロジー、第83巻、第139~191頁(1982))、その他の基質は、シグマ社製である。

【0016】

【表1】

表 1

基 質	反応時間 (時間)	分解率 (%)
ガラクトシルセラミド	2	15.8
	19	42.5
セラミド	2	8.9
	19	23.3
ガングリオシドGM1	2	0.2
	19	0.4
スフィンゴミエリン	2	0.7
	19	1.8

【0017】(4) 至適pH： 本発明の酵素の至適pHは図1に示すように8~10付近に高い活性を有している。活性測定に用いる緩衝液は、0.15MGTAA緩衝液(50mMジメチルグルタル酸、50mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、50mM2-アミノ-2-メチルー1,3-プロパンジオール)を塩酸又はNaOHを用いてpHを変化させて用いる。図1は本発明の酵素の至適pHを示す図であり、縦軸は分解率(%)、横軸は反応pHを示す。

【0018】(5) 分子量

本発明の酵素の分子量は、スーパーデックス 200(Superdex 200、ファルマシア バイオテック(Pharmacia Biotech)社製)カラム、0.1M塩化ナトリウム及び0.3%ルブロールPXを含む20mMリン酸緩衝液(pH6.8)を用い、流速0.5ml/minの条件のゲルろ過法により、約152000を示す。

【0019】本発明の酵素を用いて、リゾスフィンゴ脂質を製造するには、該酵素が作用するスフィンゴ脂質で

あればいかなるものでも基質として用いることができる。例えば、酸性糖脂質としてはGM1等の各種ガングリオシド及びスルファチド、中性糖脂質としてはアシアロGM1、セレブロシド等、スフィンゴリン脂質としてスフィンゴミエリンが挙げられる。またセラミドも基質として用いることができる。これらの基質を緩衝液中に懸濁させ、本酵素を作用させることで各種のリゾスフィンゴ脂質を得ることができる。例えば、反応液中の基質濃度を1~20mg/ml、反応温度37~40℃、反応pH6~10、通常はトリス緩衝液を用いて、緩衝液の最終濃度が25mMとなるようにして反応を行う。また、反応液中には界面活性剤としてトリトンX-100を終濃度0.5%となるように添加する。反応終了後、ODS逆相カラムクロマトグラフィーで反応生成物と未反応スフィンゴ脂質を分離する。溶出液としては、クロロホルム/メタノール/水(5/4/1、v/v)を用いることができる。HPLCのモニターは、溶出液をHPTLCで分析することにより行うことができる。HPTLCの展開溶媒はクロロホルム/メタノール/10%酢酸(5/4/1、v/v)、発色は糖脂質及びリゾ糖脂質はオルシノール硫酸法、スフィンゴミエリン及びリゾスフィンゴミエリン、セラミド及びスフィンゴシンはクマシーブルー法で行うことができる。リゾスフィンゴ脂質だけを検出したい場合は、ニンヒドリン法を用いることができる。このように、本発明の酵素を用いてリゾスフィンゴ脂質を製造することができる。

【0020】また、得られたリゾスフィンゴ脂質を再アシル化することにより各種の誘導体を得ることができる。例えば、リゾスフィンゴ脂質への脂肪酸の導入は、ジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下、脂肪酸とN-ヒドロキシコハク酸イミドとのエステルを合成し、リゾスフィンゴ脂質と反応させる方法、脂肪酸塩化物を合成し、リゾスフィンゴ脂質と反応させる方法等により再アシル化された誘導体を得ることができる。

【0021】また、本発明の酵素を用いて得られるリゾスフィンゴ脂質のスフィンゴシン部分のアミノ基を標識することにより、蛍光標識スフィンゴ脂質誘導体(蛍光標識ネオスフィンゴ脂質)を合成することができる。例えば、ダンシルクロリド、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン(4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan、NBD-F)、10-ピレンデカン酸等による標識が可能である。

【0022】更に、本酵素の逆反応を用い、標識を有し、又は有しない少なくとも2種類のスフィンゴ脂質、あるいはリゾスフィンゴ脂質と標識を有し、又は有しない脂肪酸カルボン酸又は脂肪酸カルボン酸誘導体を出発原料とし、種々のスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を合成することが可能である。例えば、¹⁴C-GalCerとスフィンゴミエリンの存在下、本酵素を作用させることにより、¹⁴Cで標識されたスフィンゴミ

エリンを得ることができる。また、例えば、¹⁴Cで標識されたステアリン酸とリゾスフィンゴミエリンの存在下、本酵素を作用させることにより、¹⁴Cで標識されたスフィンゴミエリンを得ることができる。

【0023】以上、詳細に説明したように、本発明によりスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼが提供され、該スフィンゴ脂質セラミドデアシラーゼを用いるリゾスフィンゴ脂質の製造方法が提供される。更には、本発明のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの逆反応を用いたスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法が提供される。該酵素は、スフィンゴ脂質の機能解明の研究、及び糖質工学等の分野において有用である。また、該酵素を用いて製造したリゾスフィンゴ脂質、スフィンゴ脂質の脂肪酸に代えて蛍光物質等を導入した蛍光標識スフィンゴ脂質は、スフィンゴ脂質の細胞内代謝や輸送経路の解明、スフィンゴ脂質の細胞内での機能解明等の細胞工学に有用な基質及び試薬になるばかりでなく、スフィンゴ脂質合成酵素や分解酵素の高感度な基質になることが期待される。このスフィンゴ脂質の共通構造であるセラミド部分の長鎖脂肪酸の修飾、置換を行い、均一な長鎖脂肪酸を有するスフィンゴ脂質やスフィンゴ脂質誘導体を製造することは工業的に有用であり、例えば細胞への浸透性、細胞での代謝、あるいは生物活性を改変した新しいスフィンゴ脂質誘導体を作出でき医薬、化粧品、細胞工学等への応用が可能である。

【0024】更に、本発明で初めてアトピー性皮膚炎患者の落屑からスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを生産する微生物が単離されたことにより、該微生物を用いたアトピー性皮膚炎の増悪に関与する起炎菌を同定することもできる。本発明の微生物をアトピー性皮膚炎患者から検出するには、患部から得た各種試料、例えば患部を拭った滅菌綿球、滅菌ガーゼ、滅菌綿棒や皮膚の一部、表皮の落屑等を用いて各種選択培地で培養し、スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ活性を指標にすることにより検出することが可能である。また、該微生物を抗原とする抗体を用いて免疫学的に検出することも可能である。更には該微生物の遺伝子の配列の一部を取得し、プローブ又はプライマーとして遺伝子工学的に、例えばポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法を用いて検出することも可能である。更に、アトピー性皮膚炎の検出を行うことも可能である。

【0025】

【実施例】次に実施例により本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の一例を示すものであり、本発明はこれらになんら限定されるものではない。

【0026】実施例1 アトピー性皮膚炎患者の皮膚からのスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ生産菌の単離

少量のアトピー性皮膚炎患者の落屑(表皮のはがれ落ち

た物)を100 μ lのSM-PY培地(0.5%ペプトン、0.1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、0.05%スフィンゴミエリン、及び0.05%タウロデオキシコール酸ナトリウム)に取り、25℃で3日間培養を行う。その培養液から5 μ lを取り出し、100 μ lのSM-PY培地に植え継いだ。同じ培養操作を数回繰り返した後、20 μ lの培養上清と¹⁴C-コリンラベルされたスフィンゴミエリンを含む20 μ lの50mM酢酸緩衝液(pH6.0)/0.5%トリトンX-100を混合して37℃で一晩反応させた。反応液を乾固した後、20 μ lのクロロホルム/メタノール(2:1)液に溶解し、遠心分離により不要物を除いた上清をTLCプレート(シリカゲル60、メルク社製)にのせ、ブタノール/酢酸/水(2.5:1:1)で展開した。この薄層プレートにイメージングプレートにのせた後、イメージングアナライザーBas1000(富士写真フィルム社製)を用いて反応生成物を確認したところ、スフィンゴシルホスホリルコリン(リゾスフィンゴミエリン)のバンドが見られた。培養液をSM含有トリプトソーヤ寒天培地(0.01%スフィンゴミエリン、0.05%タウロデオキシコール酸ナトリウムを含むトリプトソーヤ寒天培地(日水製薬社製))にまき、培養後得られたコロニーを100 μ lのSM合成培地(0.05%リン酸水素二カリウム、0.05%塩化アンモニウム、0.05%スフィンゴミエリン、0.05%タウロデオキシコール酸ナトリウム、0.5%塩化ナトリウム、pH7.2)で培養した。この培養液中のスフィンゴミエリンの分解物を薄層クロマトグラフにより分析し、分解活性の強いコロニーの選択を行った。薄層クロマトグラフは培養液20 μ lを蒸発乾固した試料を20 μ lのクロロホルム/メタノール(2:1)液に溶解し、遠心分離により不要物を除いた上清10 μ lをTLCプレート(シリカゲル60、メルク社製)にのせ、クロロホルム/メタノール/10%酢酸(5:4:1)で展開した。展開されたTLCプレートはオルシノール硫酸で焼き付けた後、クマシーブリリアントブルー染色液によって染色を行った。また、ニンヒドリンを用いてアミノ基の確認を行った。選択されたコロニーは上記の操作を繰り返し行いスフィンゴミエリンをリゾスフィンゴミエリンまで分解する菌株の単離を行った。以上の操作により、スフィンゴミエリンを分解する活性を持つ非発酵性グラム陰性桿菌A1-2株を単離した。

【0027】実施例2 スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの精製

0.5%ペプトン、0.1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、及び0.05%スフィンゴミエリン、及び0.05%タウロデオキシコール酸ナトリウムを含む液体培地に、非発酵性グラム陰性桿菌A1-2(FERM P-16124)を接種し、30℃で72時間培養した。培養終了後、培養液を6000rpm、30分間の

遠心分離によって菌体を除去して培養上清を得た。該培養上清を粗酵素液とした。また、この粗酵素液を20mMトリス塩酸緩衝液(0.1%ルブロール含有、pH7.5)で平衡化したDEAE-セファロースFF(DEAE-Sepharose FF、ファルマシア社製)に供し、1M塩化ナトリウムを含む同緩衝液へのグラジエント溶出により溶出した。活性画分を回収し終濃度0.8Mになるように硫酸を加え、20mM酢酸緩衝液(0.8M硫酸含有、pH6.0)で平衡化したブチルトヨパール(Butyl-Toyopearl、東ソー社製)に供し、20mM酢酸緩衝液(0.8M硫酸含有、pH6.0)、20mM酢酸緩衝液(0.4M硫酸含有、pH6.0)、20mM酢酸緩衝液(pH6.0)、20mM酢酸緩衝液(1.0%ルブロール含有、pH6.0)によって順次、溶出を行った。本酵素は20mM酢酸緩衝液(1.0%ルブロール含有、pH6.0)によって溶出された。活性画分は更に20mMリン酸緩衝液(0.1M塩化ナトリウム及び0.3%ルブロール含有、pH6.8)で平衡化したスーパーデックス200(Superdex-200、ファルマシア社製)によってゲルろ過クロマトグラフィーを行い活性画分を回収し、このようにして得られた活性画分を精製酵素とした。上述した酵素活性の測定法により、該精製酵素の活性は177mU/リットルであった。更に、該精製酵素は¹⁴C-GalCerを加水分解し、GalCerのリゾ体と¹⁴Cで標識された脂肪酸を生成する活性を有していた。

【0028】実施例3 ¹⁴C標識されたスフィンゴミエリンの製造

実施例2で得られた粗酵素液に、最終濃度1mMになるように¹⁴C-GalCerを加え、37℃、3時間反応した後、実施例2と同様の方法で生成物の確認を行ったところ、GalCerのリゾ体及び¹⁴C標識された脂肪酸、リゾスフィンゴミエリン及び¹⁴C標識されたスフィンゴミエリンが確認された。この結果、本酵素の加水分解反応により¹⁴C-GalCerから遊離した¹⁴C標識された脂肪酸が、本酵素の加水分解反応により生成したリゾスフィンゴミエリンに転移したことにより、¹⁴C標識されたスフィンゴミエリンが生成されたことが明らかとなった。したがって、本酵素が加水分解だけでなく、逆反応の活性も有していることが明らかとなった。

【0029】

【発明の効果】本発明によって、従来知られている酵素とは異なる基質特異性のスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼが提供され、該酵素を用いることによって種々のスフィンゴ脂質からリゾスフィンゴ脂質を製造する方法が提供された。また、このようにして得られたリゾスフィンゴ脂質は、その遊離アミノ基を利用して、例えば標識した脂肪酸を再導入したり、あるいは直接蛍光標識したり、更にはアルブミン等の糖鎖を有しないタンパク質と常法に従って結合させたりすることによってスフ

インゴ脂質誘導体に変換することができ、スフィンゴ脂質関連酵素の活性測定用基質、精製用アフィニティークロマトグラフィーのリガンドとして、及び抗スフィンゴ脂質抗体の抗原として、あるいはスフィンゴ脂質の機能解明の研究に用いることができ、スフィンゴ脂質の細胞内代謝や輸送経路の解明、スフィンゴ脂質の細胞内での機能解明等に有用な基質及び試薬として用いることができる。また、本発明により、アトピー性皮膚炎の増悪に関与すると考えられるスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼを生産する微生物が単離されたことにより、該微生物の純粋培養が可能となり、この微生物を駆除する

ことによるアトピー性皮膚炎の治療あるいは症状の軽減作用を持つ薬剤の新たな開発が可能となる。更に、この微生物の検出方法の開発が可能となり、アトピー性皮膚炎の患者における起炎菌の同定が容易になる。また、この微生物の生産するスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼが得られたことにより、この酵素を不活化することによりアトピー性皮膚炎の治療あるいは症状の軽減作用をもつ薬剤の開発が可能となる。

【図面の簡単な説明】

10 【図1】 本発明により得られるスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの至適pHを示す図である。

【図1】

